

**BEST AVAILABLE COPY**

- (12) **Publication of Patent Application (A)**  
(11) **Publication Number of Patent Application: JP-A-7-177876**  
(43) **Date of Publication of Application: July 18, 1995**

**[Title of the Invention]**

**CULTURE MANAGEMENT METHOD**

**[Abstract]**

**[Object] To provide a culture management method for microorganisms.**

**[Structure] A management method for a culture of microorganisms (including cells), managing the culture of the microorganisms (including cells) utilizing osmotic pressure of a culture liquid during culturing as an index. Also a culture management method for microorganisms (including cells), determining in advance the correlation between osmotic pressure of a culture liquid during culturing and at least one of the following values: substrate concentration in the culture liquid, concentration of a metabolite, and concentration of microorganisms (including cells), and managing the culture based on the correlating value.**

**[Effect] Easy and prompt monitoring and control in a process such as a material production or a cell proliferation performed by culturing microorganisms (including cells).**

**[Claims]**

**[Claim 1] A culture management method for microorganisms (including cells), characterized in managing the culture utilizing an osmotic pressure of a culture liquid during culturing as an index.**

**[Claim 2]        A culture management method for microorganisms (including cells) according to claim 1, characterized in determining in advance the correlation between an osmotic pressure of a culture liquid during culturing and at least one of the values in the group consisting of substrate concentration in the culture liquid, concentration of a metabolite, and concentration of microorganisms (including cells), and managing the culture utilizing the correlation as an index.**

**[Detailed Description of the Invention]**

**[0001]**

**[Industrial Field of Application]**

**The present invention relates to a management method for a culture of microorganisms or cells of an animal or a plant, and more particularly to a management method for a culture of such microorganisms (including cells) useful for application in monitoring and control of a process of material production, cell proliferation etc. performed by the culture of microorganisms and cells of an animal or a vegetable in food processing, typical examples being lactic fermentation, alcohol fermentation, and amino acid fermentation, a pharmaceutical process, typical examples being fermented antibiotic production and fermented production of physiologically active substances, an agricultural operation, typical examples being proliferation of animal or vegetable cells, and other areas.**

**[0002]**

**[Prior Technology]**

**Within the recent development and commercialization of technologies for producing various substances by a culture of microorganisms and animal or**

vegetable cells, an exact and prompt monitoring and control of such substance production and related processes has become extremely important in production technology.

[0003]

Various methods have been developed for monitoring and controlling material production etc. by such culture of microorganisms or animal or vegetable cells, but these methods are mostly based on successive measurements of material concentration or the like in a culture liquid and a monitoring of a change and a transition in the material concentration in such culture liquid. In general, the culture liquid is sampled according to an appropriate schedule for the culture process and, after a suitable pre-treatment such as a filtering process, a protein eliminating process, a diluting process, an extraction process with an organic solvent etc., a substrate concentration or a metabolite concentration of such culture liquid is measured by an analytical equipment such as liquid chromatography or gas chromatography or an analytical method such as an enzyme method, and the culture process is monitored and controlled based on the result of such measurement.

[0004]

However, such method requires considerable labor and time, since it is necessary, as explained above, to sample the culture liquid, to apply pre-treatments such as a filtering process, a protein eliminating process, and a diluting process, and also to successively measure a concentration of a particular substance in such culture liquid with various analytical equipment, and is thus has the drawback that simple and prompt monitoring and control of a process such as material production or cell proliferation in a timely manner is difficult

to achieve, and, in these industrial areas, it is therefore strongly desired that a new culture management technology be developed which is capable of replacing the prior method of monitoring and controlling the culture which measures material concentration in the culture liquid as explained above.

[0005]

[Problems to be Solved by the Invention]

In consideration of the aforementioned situation, the present inventors, as a result of intensive investigations for the purpose of developing a completely new culture management method capable of solving the aforementioned drawbacks in the prior technology and capable of achieving a culture management, such as monitoring and control of the culture process, in an exact, simple and prompt manner by adopting a new index in place of the aforementioned index of the material concentration in the culture liquid, have found the desired object can be attained by employing osmotic pressure in the culture liquid in the culture process as an index, thereby completing the present invention.

[0006]

More specifically, the present invention is to provide a new culture management method capable of exact and prompt monitoring and control of a process such as material production or cell proliferation by the culture of microorganisms, without utilizing means for measuring a material concentration or the like in the culture liquid that has been considered essential in the prior culture management method for microorganisms and animal or vegetable cells.

[0007]

The present invention is also intended to provide a simple culture

management method not requiring various pre-treatments which are indispensable for measuring the material concentration in the culture liquid and so were required in the prior culture management method.

[0008]

Further, the present invention is to provide a new culture management method capable of exact, simple and prompt monitoring and control of a process such as material production or cell proliferation by simply measuring an osmotic pressure of the culture liquid during the culturing process.

[0009]

[Means for Solving the Problems]

The present invention, attaining the aforementioned objects, is constituted of following technical means (1) - (2).

(1) A culture management method for microorganisms (including cells), characterized in managing the culture utilizing osmotic pressure of a culture liquid during culturing as an index.

[0010]

(2) A culture management method for microorganisms (including cells) according to (1), characterized in determining in advance the correlation between osmotic pressure of a culture liquid during culturing and at least one of the following: substrate concentration in the culture liquid, concentration of a metabolite, and concentration of microorganisms (including cells) and managing the culture utilizing the correlation as an index.

[0011]

In the following, the present invention will be explained in more detail.  
The culture management method for microorganisms (including cells) of the

present invention is applicable, as explained before, to monitoring and control of a process of material production, cell proliferation etc. performed by the culturing of microorganisms and cells of an animal or a plant in a food industry, typical examples being lactic fermentation, alcohol fermentation, amino acid fermentation etc., pharmaceutical manufacture, typical examples being antibiotic production by fermentation, production of physiologically active substances by fermentation etc., agricultural operations, typical examples being mass proliferation of animal or vegetable cells, and other areas, and can be utilized without being restricted according to the type of microorganisms or cells, or the type of fermentation method or culture method. Also the microorganisms (including cells) in the present invention mean microorganisms and cells of an animal or a vegetable, and are defined as including any microorganisms and cells of animals and vegetables regardless of type and form thereof.

[0012]

Furthermore, the culture liquid in the present invention means a culture liquid for the microorganisms or the cells in a process of material production or cell proliferation by culturing the aforementioned microorganisms or animal or vegetable cells in a certain liquid culture medium, and can be any ordinary culture liquid, and is not restricted as to the type or the composition thereof.

[0013]

Then, in the present invention, it is required to measure the osmotic pressure of the culture liquid in the culture process, and such osmotic pressure measurement can be achieved, for example, by measuring the osmotic pressure of the culture liquid in a culture tank with an osmotic pressure meter utilizing a freezing point drop, preferably an on-line osmotic pressure meter capable of

continuous measurement. The specific method can utilize suitable means and is not particularly restricted.

[0014]

Based on the investigation of the present inventors, it is found, as new findings in the course of such investigation, that osmotic pressure of the culture liquid in a suitable stage of the culture process has a certain correlation with the particular material concentrations in the culture liquid such as a substrate concentration, a metabolite concentration or a microorganisms (including cells) concentration etc. that were employed as indexes in the prior culture management method and that such osmotic pressure can be utilized as an index for the culture management, and, as a result, it was found that the culture state can be monitored during culturing of microorganisms or cells by measuring the osmotic pressure of the culture liquid in the culture process and employing such osmotic pressure as an index or calculating substrate concentration, metabolite concentration or microorganism concentration from such osmotic pressure using predetermined relational formulas and employing such values as an index.

[0015]

Thus it is made evident that, by measuring the osmotic pressure of the culture liquid by an osmotic pressure meter, preferably an on-line osmotic pressure meter capable of continuous measurement, the state of the culture liquid can be known more simply and more promptly than by the prior method of directly measuring the material concentration in the culture liquid.

[0016]

In such case, the aforementioned relational formulas can be prepared by determining in advance the correlation between measured values of the osmotic

pressure in culture liquid in the culture process and at least one of the following: substrate concentration, metabolite concentration and microorganism or cell concentration in the culture liquid, and it can be used as an index for monitoring the state of the culture. Also in this case, it is possible to suitably utilize the aforementioned osmotic pressure or another state variable calculated therefrom for controlling a suitable operation variable controlled during culturing operations, such as dilution rate in a continuous culture process in a continuous culture facility or a fed batch rate of a fresh culture medium in a fed batch culture method.

[0017]

The specific material whose concentration in the culture liquid is compared with the value of the osmotic pressure in the culture liquid, can be individually set according to the type of microorganisms or cells to be used, the type of produced substance, the type of culture liquid, culture conditions, the procedure of culturing etc., but here will be shown certain preferred examples. For example, the investigation by the present inventors found that in a culture management of a culture process for ethanol production by an alcoholic fermentation of yeast, that the osmotic pressure in the culture liquid has a certain correlation with remaining glucose concentration, ethanol concentration and bacteria concentration in the culture liquid, and it is therefore identified possible, by determining in advance the relations among these parameters, to exactly, simply, and promptly manage the culture state of the culture liquid by simply measuring the osmotic pressure of the culture liquid at a suitable time intervals in the culture process and employing such osmotic pressure as an index.



[0018]

Also the investigation by the present inventors found for example that in a culture management for a culture process for a lactic fermentation of lactobacillus, that the osmotic pressure in the culture liquid has a high correlation with lactic acid concentration, bacteria proliferation and remaining glucose concentration in the culture liquid under a certain condition, and it was therefore found possible, by determining in advance the relations among these parameters, to exactly, simply and promptly manage the culture state of the culture liquid by simply measuring the osmotic pressure of the culture liquid at suitable time intervals in the culture process and employing such osmotic pressure as an index.

[0019]

Also the investigation by the present inventors found for example that in a culture management for a fed batch culture process of chlorella in a continuous fresh culture medium supplying facility, that the osmotic pressure in the culture liquid is strongly correlated with a glucose concentration remaining in the culture liquid, and it was therefore found possible, by determining in advance the relations between the two parameters, to exactly, simply, and promptly manage the culture state of the culture liquid by simply measuring the osmotic pressure of the culture liquid at suitable time intervals in the culture process and employing such osmotic pressure as an index, thereby enabling a fed batch of glucose that is synchronized with the bacteria proliferation, and thus enabling simple and prompt control of the culture state in the fed batch culture method.

[0020]

As explained in the foregoing, the present invention enables an exact, simple and prompt culture control of the microorganisms in the culture process for the microorganisms such as yeast, lactobacillus or chlorella by merely measuring the osmotic pressure of the culture liquid, but it is made evident from comprehensive and systematic experimental results of the present inventors that such results can be obtained in the cases of other microorganisms or animal or plant cells, so that the present invention is not limited to the aforementioned microorganisms but likewise applicable to other microorganisms and animal or plant cells.

[0021]

[Effect]

As explained in the foregoing, the present invention has been developed from the finding that osmotic pressure of a culture liquid measured at a suitable stage of the culturing of microorganisms (including cells) has a stable correlation, under stable conditions, with the values of substrate concentration, metabolite concentration, cell concentration etc. which were employed as an index in the prior culture management method, and also with the values of cell metabolism rate, proliferation rate etc., and so in the present invention osmotic pressure in the culture liquid in the culture process is employed as an index for the culture management. Therefore, according to the present invention, it is possible, based on the osmotic pressure of the culture liquid in the culture process, to exactly, simply, and promptly monitor substrate concentration, metabolite concentration, cell concentration, and also cell metabolism, cell proliferation rate, and other culture states, and further, based on these values, to achieve a simple control of various operation variables for operations adjusting

the culture state, such as a culture temperature regulation, fed batch of the culture medium in synchronization with the bacteria proliferation, or optimization of dilution rate in a continuous culture.

[0022]

[Examples]

In the following, the present invention will be further clarified by examples thereof, but the present invention is not limited to such examples.

Example 1

Culture control for ethanol fermentation by yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

For the purpose of monitoring by determining remaining glucose concentration, ethanol concentration and bacteria concentration (OD660) from osmotic pressure of the culture liquid, *Saccharomyces Cerevisiae* was employed as the microorganisms and were grown in static culture at 30°C in a modified M4 culture medium (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5% and glucose 4.5%). The ethanol and glucose concentrations were measured by enzyme methods, while the osmotic pressure was measured by a freezing point drop method, and was converted to its equivalent at 273°K. Results are shown in Fig. 1. As will be apparent from Fig. 1, the osmotic pressure showed a positive proportional relationship with the bacteria proliferation and the ethanol concentration, and an apparent negative proportional relationship with the remaining glucose concentration.

[0023]

Changes in the osmotic pressure by a consumption of nutrition source other than glucose and by a metabolite other than ethanol were found to be

smaller than the influence of glucose or ethanol or found to change in time in parallel with glucose or ethanol, so that they were not individually investigated. Relations between the osmotic pressure and the remaining glucose concentration, the ethanol concentration and the bacteria concentration are shown in Fig. 2. The following relational formulas (1) - (3) were obtained over osmotic pressure range of 0.30 - 0.53 Osm/kg which occurs in the course of culture, for remaining glucose concentration  $G_r$  (g/l), ethanol concentration  $E$  (g/l), bacteria concentration  $X$  (OD660) and osmotic pressure  $\pi$  (Osm/kg) by a least square method.

[0024]

$$G_r = -185.9 \times \pi + 102.0 \quad (r = -0.996) \quad (1)$$

$$E = 105.2 \times \pi - 31.3 \quad (r = 0.972) \quad (2)$$

$$X = 24.4 \times \pi - 7.4 \quad (r = 0.982) \quad (3)$$

[0025]

In this case, it was found that the change in time of the osmotic pressure of the culture liquid had a strong correlation with the remaining glucose concentration, the ethanol concentration, and also the bacteria concentration, and that the state of the culture process can be understood by measuring the osmotic pressure of the culture liquid in the culture process. It was therefore clarified that the changes in time of the desired substrate concentration, the metabolite concentration and the cell concentration can be found by measuring the osmotic pressure of the culture liquid in the culture process of ethanol fermentation by yeast.

[0026]

Example 2

Culture control for lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei*

A culture monitoring by the osmotic pressure of the culture liquid for *Lactobacillus* was investigated, in consideration also of acid dissociation rate affected by pH. *Lactobacillus casei* was grown in static culture under at 37°C in a Rogosa culture medium (J. Inf. Dis., 110, 258-267, 1962). Changes in time of glucose concentration, a lactic acid concentration, bacteria concentration (OD660), osmotic pressure and pH are shown in Fig. 3. The osmotic pressure was converted to its equivalent at 273°K. As will be apparent from Fig. 3, the osmotic pressure showed a positive proportional relationship with the bacteria concentration and the lactic acid concentration, and an apparent negative proportional relationship with the remaining glucose concentration.

[0027]

A following Van't Hoff equation (4) was found to be valid within a range where the concentration C was not excessively large, for osmotic pressure  $\pi_{\text{atm}}$  (atm), solute mass molar concentration C (mole/kg), absolute temperature T (°K) of the solution and the pure solvent in a thermal equilibrium, and where the gas constant (0.082 kg·atm·°K<sup>-1</sup>·mole<sup>-1</sup>) is R.

$$\pi_{\text{atm}} = RTC \quad (4)$$

[0028]

Therefore, the concentration of the solute can be calculated from the equation (4), by measuring the osmotic pressure and the temperature. Principal parameters involved in the change of the osmotic pressure in the homogeneous lactic acid culture are decreases in the nutrition sources principally represented by glucose, and inversely increasing lactic acid. Also,

lactic acid shows a dissociation rate which decreases due to the influence of the culture liquid pH decreasing during culturing. It is therefore possible, as in Example 1, to calculate these culture state variables from the osmotic pressure by an approximation by a least square method based on experimental results, but a theoretical equation in consideration of the dissociation rate is more accurate.

[0029]

Therefore, the following Henderson-Hasselbalch equation for a pKa at a pH with an electrolyte dissociation rate of 50 % :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left[ \frac{\text{dissociated acid concentration}}{\text{[non-dissociated acid concentration]}} \right] \quad (5)$$

was modified to obtain the dissociation rate (%) by a following equation (6):

$$\text{dissociation rate} = \{10^{[\text{pH}-\text{pKa}]} / (10^{[\text{pH}-\text{pKa}]} + 1)\} \times 100 \quad (6).$$

[0030]

Changes in time of the nitrogen sources other than glucose and the nutrition sources such as trace components influencing the osmotic pressure were not individually measurable and were not investigated. However, these are in proportional relations with the bacteria concentration and can be represented as a product of the bacteria concentration and a constant K. Based on these and the equation (6), the osmotic pressure can be obtained from a following equation, for a osmotic pressure  $\pi$  (Osm/kg), an osmotic pressure  $\pi_i$  (Osm/kg) at the start of culture, a consumed glucose concentration G (g/l), a bacteria concentration X (OD660) and a produced lactic acid concentration L (g/l):

$$\pi = -G/180 + k \cdot X + L/90 \cdot \{10^{[\text{pH}-\text{pKa}]} / (10^{[\text{pH}-\text{pKa}]} + 1)\} + \pi_i \quad (7).$$

[0031]

The pKa of lactic acid was 3.86 and the constant K for which the measured value and the calculated value for the osmotic pressure coincide was 0.0057, and by substituting these values in the foregoing equation, there was obtained:

$$\pi = -G/180 + 0.0057 \cdot X + L/90 \cdot \{10^{[pH-3.86]}/(10^{[pH-3.86]} + 1)\} + \pi_i \quad (8).$$

[0032]

An yield of lactic acid to the consumed glucose L/G (g-lactic acid/g-glucose) and a solid yield X/G (OD660/g-glucose) were determined from experimental values as:

$$L/G = 0.85 \quad (9)$$

$$X/G = 0.51 \quad (10)$$

and the simultaneous equations (8) - (10) were solved for the consumed glucose concentration, the lactic acid concentration and the bacteria concentration to obtain following relations (11) - (13) containing osmotic pressure and pH as parameters:

$$G = (\pi - \pi_i) / [0.0094 \cdot \{10^{[pH-3.86]}/(10^{[pH-3.86]} + 1) + 1\} - 0.0085] \quad (11)$$

$$L = (\pi - \pi_i) / [0.0111 \cdot \{10^{[pH-3.86]}/(10^{[pH-3.86]} + 1) + 1\} - 0.0099] \quad (12)$$

$$X = (\pi - \pi_i) / [0.0185 \cdot \{10^{[pH-3.86]}/(10^{[pH-3.86]} + 1) + 1\} - 0.0160] \quad (13).$$

[0034]

Fig. 4 shows plotting of the values of the state variables calculated from these equations under a condition of  $\pi_i = 365$  mOsm/kg in the solid line and measured values in the dotted line. The calculated values and the measured values showed good matching, and it is clear that the desired monitoring of the changes in time of the substrate concentration, the metabolite concentration and

the cell concentration can be achieved by measuring the osmotic pressure and the pH. More specifically, in this case, the change in time of the osmotic pressure in the culture liquid showed either a high positive or negative correlation with the remaining glucose concentration, the lactic acid concentration and the bacteria concentration, and it was clarified that the state of the culture process can be understood by measuring the osmotic pressure of the culture liquid during the lactic fermentation culture with the lactobacillus.

[0035]

In a culture employing milk instead of Rogosa medium, a similar result was obtained by measuring a number of live bacteria instead of OD 660 as the bacteria amount, and could be utilized in monitoring a fermented milk producing process.

[0036]

### Example 3

Culture control in a fed batch culture process of chlorella *Chlorella regularis*

As a dark culture of chlorella in a fermentation tank is subjected to proliferation inhibition by the substrate glucose, an investigation was made on a fed batch culture in which the substrate amount was controlled by an osmotic pressure of the culture liquid. *Chlorella regularis* was cultured under aeration and agitation in a culture medium containing glucose and urea as principal components and under a condition of 35°C (Agr. Biol. Chem., 38, 1, 9-18, 1974). As in the foregoing Example 1, glucose was taken as a culture state variable representative of other substrates varying in parallel with glucose, and an investigation was made in the chlorella culture on the relationship between



glucose concentration  $G_r$  (g/l) and osmotic pressure  $\pi$  (Osm/kg) converted to its equivalent at 273°K. As a result, a high correlation (Fig. 5) was found, and the following relation was obtained by a least square method.

$$G_r = 101.6 \times \pi - 4.8 \quad (r = 0.995) \quad (14)$$

[0037]

This relation was utilized to calculate concentration of glucose remaining in the culture liquid from the osmotic pressure, and there was investigated a fed batch culture in which the glucose concentration was controlled at 3% or less. Since the osmotic pressure was 88 mOsm/kg at a glucose concentration of 5 g/l just before the glucose was exhausted and 338 mOsm/kg at 30 g/l, the addition of a fed batch culture medium containing glucose was started when the osmotic pressure reached 88 mOsm/kg and continued until the osmotic pressure reached 338 mOsm/kg, and the addition of the culture medium was started again when the osmotic pressure reached 88 mOsm/kg again. Fig. 6 shows a result of the culture continued by repeating this process.

[0038]

The chlorella concentration was represented as packed cell volume (PCV ml/l). In the culture system based on the osmotic pressure, the calculated values and the measured values of glucose showed good matching, glucose could be controlled at 3% or less without ever being exhausted and could be exponentially batch-fed in synchronization with the bacteria proliferation. The fed batch culture control based on the osmotic pressure value was identified as an excellent method which was simple and prompt.

[0039]

In case of chlorella, glucose as the substrate is consumed in the course of culture process, but has to be suitably added in the course of culture as the glucose concentration that can be added at the start of culture is limited. Because of high correlation between the osmotic pressure and the glucose concentration was found, it was found that the culture control of chlorella can be conducted by the osmotic pressure measurement.

[0040]

[Effect of the Invention]

As explained in the foregoing, the present invention relates to a culture management method for microorganisms (including cells), characterized in managing the culture utilizing osmotic pressure of a culture liquid during culturing as an index, and the present invention enables easy and prompt monitoring and control of the culture state in a process such as material production or cell proliferation performed by a culture of microorganisms (including cells).

[0041]

The present invention also allows determination in advance of the correlation between osmotic pressure of a culture liquid during culturing and at least one of the following: substrate concentration in the culture liquid, concentration of a metabolite, and concentration of microorganisms (including cells), and achievement of exact, easy, and prompt monitoring and control of a culture of microorganisms (including cells) utilizing such correlation as an index.

[Brief Description of Drawings]

[Fig. 1] Showing change in time of culture state variables in a yeast culture

process.

[Fig. 2] Showing the relation between osmotic pressure and culture state variables in a yeast culture process.

[Fig. 3] Showing change in time of culture state variables in a lactic acid culture process.

[Fig. 4] Showing change in time of calculated values and measured values of culture state variables.

[Fig. 5] Showing relation between osmotic pressure and glucose concentration in a chlorella culture process.

[Fig. 6] Showing a change in time of status variables in a fed batch culture utilizing, as an index, a glucose concentration calculated from osmotic pressure.

[Fig. 1]

left: glucose concentration (g/l) ●, ethanol concentration (g/l) ▲, bacteria concentration OD660 ■

center: culture time (h)

right: osmotic pressure (mOsm/kg) O

[Fig. 2]

left: glucose concentration (g/l) ●, ethanol concentration (g/l) ▲, bacteria concentration OD660 ■

center: osmotic pressure (mOsm/kg) O

[Fig. 3]

left: glucose concentration (g/l) ●, ethanol concentration (g/l) ▲, bacteria concentration OD660 ■, pH Δ

center: culture time (h)

**right: osmotic pressure (mOsm/kg) O**

**[Fig. 4]**

**left: glucose concentration (g/l) ●, ethanol concentration (g/l) ▲, bacteria concentration OD660 ■**

**center: culture time (h)**

**[Fig. 5]**

**left: glucose concentration (g/l)**

**center: osmotic pressure (mOsm/kg)**

**[Fig. 6]**

**left: glucose concentration (g/l) ●, bacteria concentration PCV (ml/l) ■**

**right: osmotic pressure (mOsm/kg) O**

**center: culture time (h)**

**glucose fed batch**

**glucose fed batch**

**glucose fed batch**

**osmotic pressure**

**glucose**

**bacteria number**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-177876

(43) 公開日 平成7年(1995)7月18日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N	1/00	B	8828-4B	
	1/12	A	8828-4B	
	1/16	B	8828-4B	
	1/20	A	8828-4B	
C 1 2 P	7/06		8114-4B	

審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平5-346562

(22) 出願日 平成5年(1993)12月22日

(71) 出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社  
東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72) 発明者 早川 和仁

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72) 発明者 竹内 聡吾

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(74) 代理人 弁理士 須藤 政彦

(54) 【発明の名称】 培養管理方法

(57) 【要約】

【目的】 微生物の培養管理方法を提供する。

【構成】 微生物（細胞を含む）の培養の管理方法において、培養工程における培養液の浸透圧の値を指標にして、培養を管理する微生物（細胞を含む）の培養管理方法。更には、予め、培養工程における培養液の浸透圧の値と、培養液の基質濃度、代謝産物濃度、または微生物（細胞を含む）濃度の少なくとも1種の値との相関関係を求め、これを指標にして、培養を管理する微生物（細胞を含む）の培養管理方法。

【効果】 微生物（細胞を含む）の培養による物質生産、細胞増殖などのプロセスにおける培養状態の監視及び制御等を簡便、かつ迅速に行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微生物（細胞を含む）の培養の管理方法において、培養工程における培養液の浸透圧の値を指標にして、培養を管理することを特徴とする微生物（細胞を含む）の培養管理方法。

【請求項 2】 上記請求項 1 記載の培養管理方法において、予め、培養工程における培養液の浸透圧の値と、培養液の基質濃度、代謝産物濃度、または微生物（細胞を含む）濃度の少なくとも 1 種の値との相関関係を求め、これを指標にして、培養を管理することを特徴とする微生物（細胞を含む）の培養管理方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微生物、及び動物、植物などの細胞の培養の管理方法に関するものであり、更に詳しくは、乳酸発酵、アルコール発酵、アミノ酸発酵等に代表される食品分野、また、抗生物質発酵生産、生理活性物質発酵生産等に代表される医薬品分野、動物細胞、植物細胞の増殖等に代表される農業分野、及びその他の分野における微生物、及び動物、植物などの細胞の培養による物質生産、細胞増殖などのプロセスの監視及び制御などに適用するのに有用な当該微生物（細胞を含む）の培養管理方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】近年、微生物、及び動物、植物などの細胞を培養することによる各種の物質生産技術が開発され、実用化される中で、当該物質生産などのプロセス監視及び制御を正確、かつ迅速に行うことが生産技術上きわめて重要な地位を占めるに至っている。

【0003】従来、このような微生物、及び動物、植物などの細胞の培養による物質生産などのプロセス監視及び制御等を行う方法は、種々開発されているものの、いずれの方法も、当該微生物等の培養工程において、培養液の物質濃度等を逐次測定すると共に、当該培養液中の物質濃度等の変化及び推移を監視しながら行うものがほとんどであり、一般に、例えば、培養工程の適宜の時機において培養液を採取し、予め濾過処理、除蛋白処理、希釈処理、有機溶媒による抽出処理等の適宜の前処理を行ってから、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等の分析機器や酵素法などの分析方法で当該培養液の基質濃度や代謝産物濃度等を測定し、その測定結果に基づいて培養のプロセス監視及び制御等を行っていた。

【0004】しかしながら、このような方法は、前記の如く、培養液を採取し、更に、予め、濾過処理、除蛋白処理、希釈処理等の前処理を施すことが必要であり、更に、各種分析機器で当該培養液中の特定の物質濃度等を逐次測定することが必要とされるなど、かなりの労力と時間のかかる方法であることから、物質生産、細胞増殖などのプロセスの監視及び制御等を時宜を得て簡便、か

つ迅速に行うことが困難であるという問題点を有しており、従って、当業界においては、前記のような培養液中の物質濃度等を測定し、培養のプロセス監視及び制御等を実施する従来の方法に代わる新しい培養の管理技術を開発することが強く要請されている状況にあった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】このような状況を踏まえ、本発明者らは、前記の如き従来技術の問題点を確実に解決し得ると共に、前記のような培養液中の物質濃度等の指標に代わる新しい指標を採用し、正確で、簡便、かつ迅速に培養のプロセスの監視及び制御等の培養の管理を実施することが可能な全く新しい培養管理方法を開発することを目標として鋭意研究を積み重ねた結果、培養工程における培養液の浸透圧の値を指標とすることにより所期の目的を達成し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、従来、微生物、及び動物、植物などの細胞の培養の管理方法において必須の手段として必要とされていた培養液の物質濃度等を測定する手段を採用することなく、当該微生物等の培養による物質生産、細胞増殖などのプロセスの監視及び制御を正確、かつ迅速に実施することが可能な新しい培養管理方法を提供することを目的とするものである。

【0007】また、本発明は、従来の培養管理方法で必要とされていた培養液の物質濃度等を測定するために不可欠の各種前処理操作を必要としない簡便な培養管理方法を提供することを目的とするものである。

【0008】更に、本発明は、培養工程における培養液の浸透圧を測定するだけで、正確で、簡便、かつ迅速に培養による物質生産、細胞増殖などのプロセスの監視及び制御等を行うことが可能な新しい培養管理方法を提供することを目的とするものである。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成する本発明は、以下の（１）～（２）の技術的手段から構成されるものである。

（１）微生物（細胞を含む）の培養の管理方法において、培養工程における培養液の浸透圧の値を指標にして、培養を管理することを特徴とする微生物（細胞を含む）の培養管理方法。

【0010】（２）上記（１）記載の培養管理方法において、予め、培養工程における培養液の浸透圧の値と、培養液の基質濃度、代謝産物濃度、または微生物（細胞を含む）濃度の少なくとも 1 種の値との相関関係を求め、これを指標にして、培養を管理することを特徴とする微生物（細胞を含む）の培養管理方法。微生物（細胞を含む）の培養の管理方法において、培養液の浸透圧の値を指標とすることを特徴とする微生物（細胞を含む）の培養管理方法。

【0011】次に、本発明について更に詳細に説明す

る。本発明の微生物（細胞を含む）の培養管理方法は、前記の如く、乳酸発酵、アルコール発酵、アミノ酸発酵などに代表される食品分野、また、抗生物質発酵生産、生理活性物質発酵生産などに代表される医薬品分野、動物細胞、植物細胞の大量増殖等に代表される農業分野、及びその他の分野における微生物、及び動物、植物などの細胞の培養における物質生産、細胞増殖などのプロセスの監視及び制御などに適用されるものであり、その微生物、細胞の種類、及び発酵方法、培養方法等の種類に限定されることなく利用することが可能である。また、本発明でいうところの微生物（細胞を含む）とは、微生物、及び動物、植物などの細胞を意味するものであり、その種類及び形態を問わず適宜の微生物、及び動物、植物の細胞をも含むものとして定義されるものである。

【0012】更に、本発明でいうところの培養液とは、前記微生物、及び動物、植物などの細胞を一定の液体培地により培養し、物質生産、細胞増殖などを実施する培養プロセスにおける当該微生物、及び細胞の培養液を意味するものであり、いわゆる通常の培養液であれば如何なるものであってもよく、その種類、組成等に限定されるものではない。

【0013】次に、本発明においては、培養工程における培養液の浸透圧を測定することが必要とされるが、当該浸透圧を測定する方法は、例えば、氷点降下法等を利用した浸透圧計、望ましくは連続測定可能なオンライン浸透圧計にて、培養タンク中の培養液の浸透圧を計測すればよく、その具体的方法は、適宜の手段でよく、特に限定されるものではない。

【0014】本発明者らの研究したところによれば、これまでの研究過程の中で、培養工程の適宜の段階における培養液の浸透圧の値は、従来の培養管理方法において指標とされていた基質濃度、代謝産物濃度、又は微生物（細胞を含む）濃度等のいわゆる培養液中の物質濃度と一定の相関関係があること、そして当該浸透圧の値を培養管理の指標として利用し得ることが新しい知見として見い出され、その結果、微生物、及び細胞の培養において、培養工程における培養液の浸透圧を測定することにより、当該浸透圧の値を指標として、あるいは予め求めた関係式により、当該浸透圧の値から基質濃度、代謝産物濃度、あるいは細胞濃度を算出し、それを指標として、培養の状態を監視することができることが明らかとなった。

【0015】即ち、浸透圧計、望ましくは連続測定可能なオンライン浸透圧計にて、培養工程における培養液の浸透圧を計測することにより、従来のような培養液中の物質濃度等を直接測定する方法よりも簡便、かつ迅速に培養液の状態を知ることができることが明らかとなった。

【0016】この場合、例えば、上記関係式は、予め、培養工程における培養液の浸透圧の測定値と、当該培養

液の基質濃度、代謝産物濃度、又は微生物、及び細胞濃度の少なくとも1種の数値との相関関係を求めることにより作成することが可能であり、これを指標として培養の状態を監視することができる。更に、この場合、例えば、連続式培養設備における連続培養方法の希釈率、流加培養方法による新鮮培地の流加速度の制御等の如く、培養プロセスにおける任意の操作変数の制御に、上記浸透圧の値あるいはそれから算出される他の状態変数を利用することも適宜可能である。

【0017】培養液の浸透圧の値と対比される当該培養液中の物質濃度等の具体的内容は、使用する微生物、及び細胞の種類、産生される物質の種類、培養液の種類、培養条件、培養形態等によって個別的に設定すればよいが、その好適な例を幾つか例示すると、例えば、本発明者らの研究によれば、酵母のアルコール発酵によるエタノール生産の培養プロセスにおける培養管理の場合、培養液の浸透圧と当該培養液中の残存グルコース濃度、エタノール濃度、及び菌体濃度の関係に一定の相関関係があることが見い出され、従って、予め、当該各因子間の関係式を求めておけば、培養プロセスの適宜の時期において培養液の浸透圧を測定するだけで、当該浸透圧の値を指標として、培養液の培養状態を正確で、簡便、かつ迅速に培養の管理を行うことができることが判った。

【0018】また、例えば、乳酸菌の乳酸発酵の培養プロセスにおける培養管理の場合、本発明者らの研究によれば、培養液の浸透圧と、培養液の乳酸濃度、菌体増殖、及び残存グルコース濃度との間には、一定の条件のもとに、一定の比例関係があることが見い出され、従って、予め、当該各因子間の関係式を求めておけば、培養プロセスの適宜の時期において培養液の浸透圧を測定するだけで、当該浸透圧の値を指標として、培養液の培養状態を正確で、簡便、かつ迅速に管理することができることが判った。

【0019】また、例えば、連続式新鮮培地供給培養設備におけるクロレラの流加培養方法による培養プロセスにおける培養管理の場合、本発明者らの研究によれば、培養液の浸透圧と、培養液中に残存するグルコース濃度との間に高い相関性があることが見い出され、従って、予め、両者の関係式を求めておけば、培養プロセスの適宜の時期において培養液の浸透圧を測定するだけで、当該浸透圧の値を指標として、培養液の培養状態を正確で、簡便、かつ迅速に管理することができ、これにより、菌体増殖に同調させてグルコースを流加することが可能となり、流加培養方式による培養状態の制御を簡便、かつ迅速に行うことができることが判った。

【0020】このように、本発明によれば、前記した如く、それぞれ、酵母、乳酸菌、クロレラ等の微生物の培養プロセスにおける当該微生物の培養管理を、当該培養液中の浸透圧を測定するだけで、正確で、簡便、かつ迅速に行うことができるが、かかる結果は、他の微生物、

動物細胞、植物細胞の場合においても同様に得られることが、本発明者らの総合的、かつ系統的な実験結果から明らかとなっており、従って、本発明は、これらの微生物に限らず、当該微生物の場合と同様に、他の微生物、及び動物、植物等の細胞の場合にも、同様に適用し得るものである。

#### 【0021】

【作用】本発明は、前記の如く、微生物（細胞を含む）の培養の培養プロセスの適宜の時期において測定される培養液の浸透圧の値は、従来の培養の管理方法の指標として使用されている基質濃度、代謝産物濃度、細胞濃度等の物質濃度の値、更には、細胞の代謝、及び増殖速度等の値、との間に、一定の条件において、一定の相関関係を有するという事実を前提として開発されたものであり、本発明においては、培養工程における培養液の浸透圧の値が培養管理の指標として用いられる。従って、本発明によれば、培養プロセスにおける培養液の浸透圧の値から、培養液中の基質濃度、代謝産物濃度、細胞濃度、更に、細胞の代謝及び増殖速度、その他の培養状態を、正確で、簡便、かつ迅速に監視することが可能であり、更には、それらの値に基づいて菌体増殖等に同調させた培養温度の調整や培地の流加、連続培養における希釈率の最適化の決定等の培養状態に応じた各種の操作変数の制御等を簡便に実施することができる。

#### 【0022】

【実施例】続いて、本発明の実施例を示して本発明を更に具体的に説明するが、本発明は、当該実施例に限定されるものではない。

$$Gr = -185.9 \times \pi + 102.0 \quad (r = -0.996) \quad (1)$$

$$E = 105.2 \times \pi - 31.3 \quad (r = 0.972) \quad (2)$$

$$X = 24.4 \times \pi - 7.4 \quad (r = 0.982) \quad (3)$$

【0025】この場合は、培養液の浸透圧の経時変化は、残存グルコース濃度、アルコールの濃度、及び菌体濃度のいずれとも高い相関関係を示し、培養中の培養液の浸透圧を測定することで、培養工程の状態が把握することが判った。従って、酵母によるエタノール発酵の培養工程における培養液の浸透圧を測定することにより、目的とする基質濃度、代謝産物濃度及び細胞濃度の経時変化を監視できることが明らかとなった。

#### 【0026】実施例2

乳酸菌ラクトバチルス・カゼイによる乳酸発酵の培養管理

pHの影響を受ける酸の解離率も考慮し、乳酸菌の培養中の浸透圧による培養監視を検討した。Rogosa培地(J.

$$\pi_{atm} = R T C$$

が成り立つ。

【0028】従って、浸透圧と温度を測定することにより、上記(4)式より、溶質の濃度を算出することができる。ホモ乳酸菌培養において浸透圧変化に関与する主因子としては、グルコースを主とする栄養源の減少と逆

#### 実施例1

酵母サッカロマイセス・セレビシエによるエタノール発酵の培養管理

培養液の浸透圧値から残存グルコース濃度、エタノール濃度、菌体濃度(OD660)を求めて監視することを目的に、微生物としてSaccharomyces cerevisiae IFD10217を使用し、これを改変YM培地(酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ペプトン0.5%、グルコース4.5%)で、30℃の条件下に、静置培養した。エタノール及びグルコース濃度は、酵素法で測定し、また浸透圧は、氷点降下法により測定し、273°Kに換算した。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、浸透圧は、菌体増殖とエタノール濃度に対しては、正の比例関係を示し、また残存グルコース濃度に対しては、見かけ上、負の比例関係があった。

【0023】グルコース以外の栄養源の消費、及びエタノール以外の代謝産物による浸透圧変化は、グルコースやエタノールの影響に比べると小さく、またグルコースあるいはエタノールとパラレルに経時変化することが判ったので、各々の検討は行わなかった。浸透圧と、残存グルコース濃度、エタノール濃度、及び菌体濃度の関係を第2図に示す。残存グルコース濃度(g/l)をGr、エタノール濃度(g/l)をE、菌体濃度(OD660)をX、また浸透圧(0sm/kg)を $\pi$ とすると、培養中に変化する0.30~0.530sm/kgの浸透圧の範囲において、最小二乗法により以下の(1)~(3)の関係式を得た。

#### 【0024】

Inf. Dis., 110, 258-267, 1962)で、Lactobacillus caseiを37℃の条件下で静置培養した。グルコース濃度、乳酸濃度、菌体濃度(OD660)、浸透圧、pHの培養経時変化を図3に示した。浸透圧は、273°Kに換算して示した。図3から明らかなように、浸透圧は、菌体増殖と乳酸濃度に対しては正の比例関係を示し、また残存グルコース濃度に対しては、見かけ上、負の比例関係があった。

【0027】浸透圧を $\pi_{atm}$ (atm)、溶質の質量モル濃度をC(mole/kg)、溶液と純溶媒の熱平衡時の絶対温度をT(°K)、気体定数(0.082 kg·atm·°K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>)をRとすると、濃度Cがあまり大きくならない範囲では、以下の(4)のVan'tHoffの式

$$(4)$$

に増加して行く乳酸がある。更に、乳酸は、培養経時的に低下する培養液のpHの影響により解離率が小さくなる。従って、上記実施例1のように、実験値に基づく最小二乗法による近似式で、各状態変数を浸透圧から算出することも可能だが、解離率を考慮した理論式を用いた



方がより正確となる。

【0029】そこで、電解質の解離率が50%のときの

$$pH = pK_a + \log \left[ \frac{\text{解離濃度}}{\text{非解離濃度}} \right] \quad (5)$$

を變形することにより、解離率(%)は、以下の(6)の式、

$$\text{解離率} = \left\{ 10^{[pH-pK_a]} / (10^{[pH-pK_a]} + 1) \right\} \times 100 \quad (6)$$

として求めることができる。

【0030】浸透圧変化に影響を与えるグルコース以外の窒素源や微量成分等の栄養源の経時変化を各々に測定することは不可能であり、行っていない。しかしながら、これらは、菌体濃度と比例関係にあり、菌体濃度と

$$\pi = -G/180 + k \cdot X + L/90 \cdot \left\{ 10^{[pH-pK_a]} / (10^{[pH-pK_a]} + 1) + 1 \right\} + \pi_i \quad (7)$$

【0031】乳酸の $pK_a$ は3.86、また浸透圧の実測値と計算値が一致するような定数 $k$ を求めると、-

$$\pi = -G/180 - 0.0057 \cdot X + L/90 \cdot \left\{ 10^{[pH-3.86]} / (10^{[pH-3.86]} + 1) + 1 \right\} + \pi_i \quad (8)$$

が得られた。

【0032】消費グルコースに対する乳酸収率 $L/G$

$$L/G = 0.85 \quad (9)$$

$$X/G = 0.51 \quad (10)$$

であるから、上記(8)～(10)の式の連立方程式を、消費グルコース濃度、乳酸濃度、菌体濃度について解くと、浸透圧と $pH$ をパラメータとする以下の(11)

$$G = (\pi - \pi_i) / [0.0094 \cdot \left\{ 10^{[pH-3.86]} / (10^{[pH-3.86]} + 1) + 1 \right\} - 0.0085] \quad (11)$$

$$L = (\pi - \pi_i) / [0.0111 \cdot \left\{ 10^{[pH-3.86]} / (10^{[pH-3.86]} + 1) + 1 \right\} - 0.0099] \quad (12)$$

$$X = (\pi - \pi_i) / [0.0185 \cdot \left\{ 10^{[pH-3.86]} / (10^{[pH-3.86]} + 1) + 1 \right\} - 0.0160] \quad (13)$$

【0034】 $\pi_i = 365 \text{ mOsm/kg}$ の条件で、この式より算出される各状態変数数値を実線で、実測値をドットで図4にプロットした。計算値と実測値とはよく一致しており、浸透圧と $pH$ を測定することにより、目的とする基質濃度、代謝産物濃度、細胞濃度の経時変化を監視できることが明らかとなった。即ち、この場合は、培養液の浸透圧の経時変化は、残存グルコース濃度、乳酸濃度、及び菌体濃度のいずれとも正又は負の高い相関関係を示し、乳酸菌による乳酸菌発酵の培養中の培養液の浸透圧を測定することで、培養工程の状態が把握できることが判った。

【0035】Rogosa培地の代わりにミルクを用いた培養において、菌体量としてOD660の代わりに生菌数を測定したところ同様な結果が得られ、発酵乳製造プロセスの監視にも活用できた。

$$Gr = 101.6 \times \pi - 4.8 \quad (r=0.995) \quad (14)$$

【0037】この関係式を利用し、培養液中に残存するグルコースの濃度を浸透圧値から算出し、グルコース濃度を3%以下に制御する流加培養を検討した。グルコースが枯渇する直前の5g/lのときの浸透圧は88mOsm/kg、30g/lの時は338mOsm/kgであるので、培養の制御液として、浸透圧88mOsm/kgになった時点でグルコースを

$pH$ を $pK_a$ とすると、以下の(5)のHenderson-Hasselbalchの式

ある定数 $k$ との積として表せる。以上のことから、浸透圧(0sm/kg)を $\pi$ 、培養開始時の浸透圧(0sm/kg)を $\pi_i$ 、消費グルコース濃度(g/l)を $G$ 、菌体濃度(OD660)を $X$ 、生成乳酸濃度(g/l)を $L$ とすると、浸透圧値は、(6)式により以下の式で得られる。

0.0057が得られ、これらを上式に代入すると、

( $g$ -乳酸/ $g$ -グルコース)及び菌体収率 $X/G$ (OD660/ $g$ -グルコース)は、実験値より、それぞれ、

1)～(13)の関係式が得られた。

【0033】

### 【0036】実施例3

クロレラ、クロレラ・レギュラリスの流加培養工程における培養管理

発酵槽によるクロレラの暗培養において、基質であるグルコースによる増殖阻害を受けるので、培養液の浸透圧値から基質量を制御する流加培養を検討した。Chlorella regularis をグルコースと尿素を主成分とする培地にて、35℃の条件下で、通気攪拌培養を行った(Agr. Bio. l. Chem., 38, 1, 9-18, 1974)。上述の実施例1と同様に、グルコースと連動して変化する他の基質等も含めて、グルコースを代表状態変数として、クロレラ培養時のグルコース濃度 $Gr$ (g/l)と273°Kに換算したときの浸透圧 $\pi$ (0sm/kg)の関係を検討した。その結果、高い相関性(図5)があることを見出し、最小二乗法により以下の関係式を得た。

含む流加培地の添加を始め、338mOsm/kgになるまで添加を続け、ふたたび浸透圧88mOsm/kgになったところで培地の流加を行った。この方法を繰り返して培養を続けた結果を図6に示した。

【0038】クロレラ濃度は、バックドセルボリューム(PCV ml/l)で表した。浸透圧値に基づく培養系内

でのグルコース濃度の計算値と実測値はよく一致し、グルコースは、枯渇することなく3%以下に制御され、菌体増殖に同調させて指数的に流加できた。浸透圧値に基づく流加培養制御は、簡便、かつ迅速で優れた方法であることが判った。

【0039】クロレラの場合は、基質としてのグルコースが培養工程中に消費されるが、培養初期に添加できるグルコース濃度は制限があるので、培養途中で適宜追加する必要がある。また、浸透圧とグルコース濃度に高い相関があることが判ったので、クロレラの培養管理を、浸透圧の測定で行うことができることが判った。

【0040】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明は、微生物（細胞を含む）の培養の管理方法において、培養工程における培養液の浸透圧の値を指標とすることを特徴とする微生物（細胞を含む）の培養管理方法に関するものであり、本発明によれば、微生物（細胞を含む）の培養による物質生産、細胞増殖などのプロセスにおける培養状態の監視及び制御等を簡便、かつ迅速に行うことができる。

【0041】また、本発明によれば、予め、培養工程における培養液の浸透圧の値と、培養液の基質濃度、代謝産物濃度、又は微生物（細胞を含む）濃度の少なくとも1種の値との相関関係を求め、これを指標にして、微生物（細胞を含む）の培養のプロセス監視、及び制御等を正確で、簡便、かつ迅速に管理することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】酵母の培養プロセスにおける各状態変数の経時変化を示す。

【図2】酵母の培養プロセスにおける浸透圧と各状態変数の関係を示す。

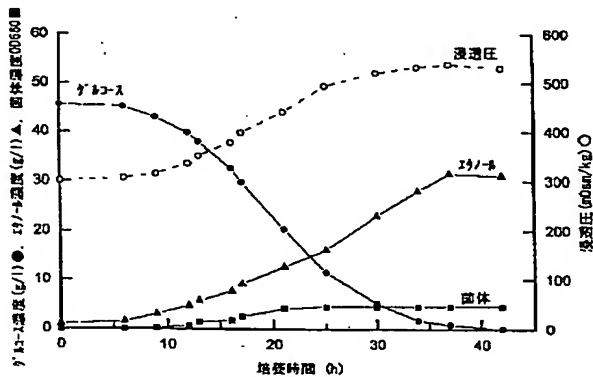
【図3】乳酸菌の培養プロセスにおける各状態変数の経時変化を示す。

【図4】各状態変数の計算値と実測値の経時変化を示す。

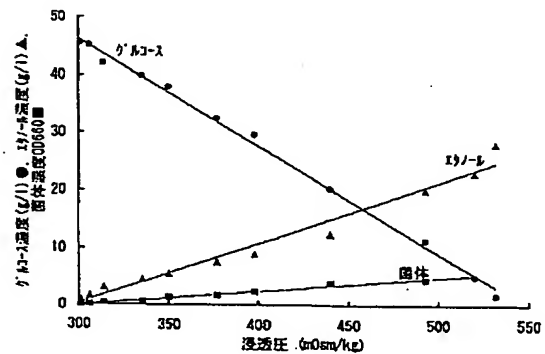
【図5】クロレラの培養プロセスにおける浸透圧とグルコース濃度との関係を示す。

【図6】浸透圧値から算出したグルコース濃度を指標とした流加培養における各状態変数の経時変化を示す。

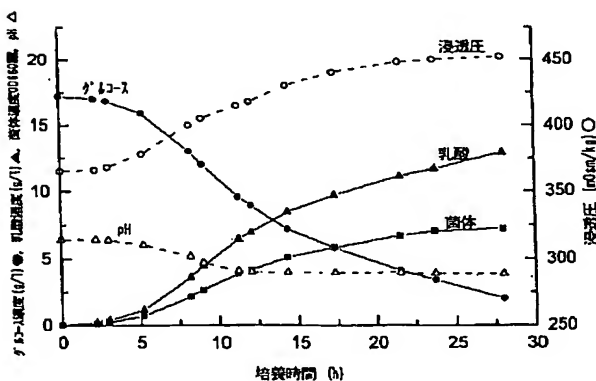
【図1】



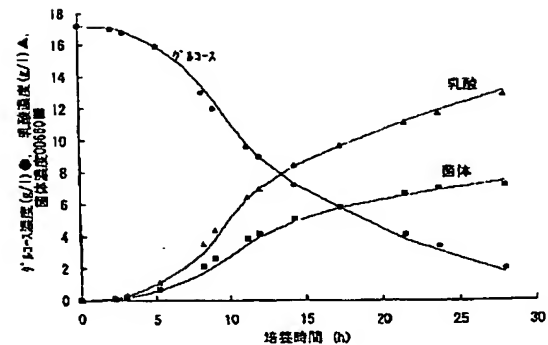
【図2】



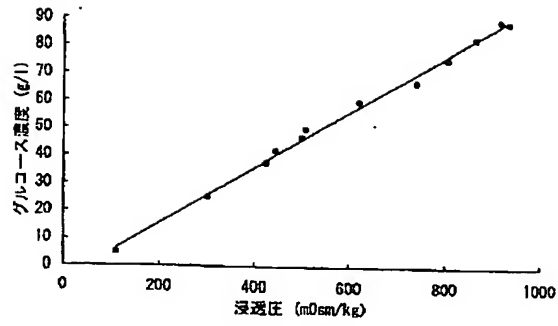
【図3】



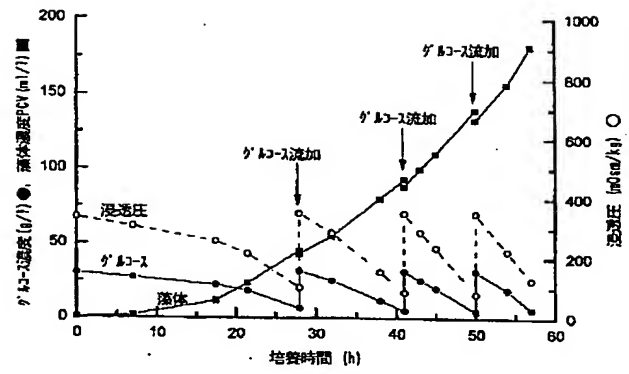
【図4】



【図5】



【図6】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**